

⑩ 日本国特許庁 (JP)
 ⑪ 特許出願公表
 ⑫ 公表特許公報 (A)

昭63-503242

⑬ Int.Cl.

G 01 N 33/58
 C 12 Q 1/68
 1/70
 G 04 D 7/00
 G 09 F 3/03

識別記号

序内整理番号
 A-8305-2G
 A-6807-4B
 6807-4B
 6781-2F
 D-6810-5C

審査請求 未請求

予備審査請求 未請求

部門(区分) 6 (1)

(全 11 頁)

⑭ 発明の名称 真偽を立証したい物品の標識

⑮ 特 願 昭62-502252
 ⑯ 出 願 昭62(1987)4月9日

⑭ 公表 昭和63年(1988)11月24日

⑮ 翻訳文提出日 昭62(1987)12月9日

⑯ 国際出願 PCT/CB87/00242

⑯ 國際公開番号 WO87/06383

⑯ 國際公開日 昭62(1987)10月22日

優先権主張 ⑭ 1986年4月9日 ⑮ イギリス(GB) ⑯ 8608629

⑭ 発明者 リ・ページ、リチャード・ウイリアム・フラー ⑮ イギリス国、ケンブリッジ・シー・ピー・2・1・ティ・エイ、ゴンビル・アンド・カイウス・カレッジ(番地なし)

⑭ 発明者 スレイター、ジェイムズ・ハワード ⑮ イギリス国、カーディフ・シー・エフ・4・5・エス・アール、リズベイン、ホウル・ワイ・ディリン・38

⑭ 出願人 バイオタル・リミテッド ⑮ イギリス国、カーディフ・シー・エフ・4・5・ディー・エル、チルターン・クロウズ・5

⑭ 代理人 弁理士 川口義雄 外2名

⑭ 指定国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB, GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許), US

請求の範囲

1. 真偽を立証したい品物または物質の標識方法であって、所定の巨大分子の第一化合物(シグナル化合物)を用いてこの第一化合物の正体を明らかにすることなく品物または物質を標識し、この第一の化合物には相補的な第二の化合物が結合し得、その結果第一の化合物の存在を明らかにし、したがって品物または物質が本物であることを立証できるようになっていることを特徴とする方法。

2. シグナル化合物を直接品物もしくは物質中に組み込むか、シグナル化合物を品物もしくは物質に付着せしめるか、シグナル化合物を含んでいる材料を品物もしくは物質に塗布適用するか、またはシグナル化合物を品物もしくは物質の内容物中に含ませることによって、標識を達成する、請求の範囲1に記載の方法。

3. シグナル化合物が付着しているタグを用いて品物を標識する、請求の範囲1に記載の方法。

4. タグを、直接物品に取り付けるか、物品の構造の一部として物品中に直接組み込むか、またはその他のやり方で物品に結合する、請求の範囲3に記載の方法。

5. 巨大分子の形態にあるシグナル化合物を用いて品物または物質を標識する、請求の範囲1に記載の方法。

6. 細菌もしくはカビ類の胞子の形態またはウィルスの形態にあるシグナル化合物を用いて品物または物質を標識する、請求の範囲1に記載の方法。

7. シグナル化合物が核酸である、請求の範囲1に記載の方法。

8. 核酸がDNAである、請求の範囲7に記載の方法。

9. DNAが、特異的DNAプローブとハイブリダイズし得る1個以上のシグナル配列を含んでいる、請求の範囲8に記載の方法。

10. 前記DNAを他のDNAと混合する、請求の範囲8に記載の方法。

11. DNAが、微生物のゲノムDNAまたは細胞エンドヌクレアーゼによるその部分消化物に由来するDNAである、請求の範囲8に記載の方法。

12. DNAがプラスミドの形態にある、請求の範囲8に記載の方法。

13. DNAが合成DNAである、請求の範囲8に記載の方法。

14. 各々が別々の領域を占めている一連の異なるシグナル化

特表昭63-503242 (2)

合物を準備する、請求の範囲1に記載の方法。

15. 一連の別々の領域の同一のシグナル化合物を準備する、請求の範囲1に記載の方法。

16. 賃料品、医薬およびその他の化学薬品、フィルムおよびレコード、銀行券、美術工芸品、証書類ならびに機会および部品から選択された品物または物質を標識する、請求の範囲1に記載の方法。

17. その機品物または物質がシグナル化合物で標識されているかどうかを、第一の化合物の存否を明らかにできるように相補的な第二の化合物を用いて決定し、その結果品物または物質が本物であることを確かめることをさらに含んでいる、請求の範囲1に記載の方法。

18. 品物または物質の真偽を決定するための方法であって、
(i) 品物または物質が所定の巨大分子の第一化合物（「シグナル化合物」）によって標識されているかどうかを、第一の化合物の存否を明らかにできるようにこの第一の化合物に結合することができる相補的な第二の化合物を用いて決定し、その結果、
(ii) 品物または物質が本物であることを決定することを特徴とする方法。

明　　細　　書

真偽を立証したい物品の標識

本発明は物品の真偽を立証する(*to authenticate*)ための物品の標識(ラベル付け)に関する。

現代の世界は多くの領域で真偽の立証に関する重要な問題に直面している。製造業界でみられるような大量生産された模造品にしても昔の世界でみられるような假作に至っても、これらは混亂を引きこし、かつ眞の製作者にとっては収益の消失を招く。産業の発達した国々の内での世界貿易に関しては貿物製造者の行為によって何光ものドルが失われると推定されている。時計、電気製品、ハイファッショング衣類などのような一決で価値の高い物品の製造業者にとっては事は特に重大である。生産国または外因での模造品の販売は産業界にとって商取引上の主要な紛争である。明らかに、高の高い低価格の偽品もまた模倣と訴訟的販売の対象になる。

さらに、個人、法人、公共団体および政府が真偽の辨別以外の理由で本物の品物を標識したいと思うのには多くの理由がある。たとえば、ある物品または品物(アイテム)の最終的な選

命の確認を可能にするように流通・販売網(ネットワーク)に沿った本物の品物の流れを追跡記録(モニター)するためである。これによってある特定の流通ネットワークの他と比べた効率に関する情報が得られるであろう。そしてこの場合明らかに模倣に対して対処する必要はほとんどない。しかしこの原理は、品物を一様に、そして標識された品物の明白な同定を可能にするシステムによって標識する場合もやはり同じである。

それ自体模倣されることなく、したがって模造された假の品物を保護するのに雇用されることのない完全に安全な保護システムを得るためにいろいろな作動モードに適用することができるシステムに対するニーズがある。そのようなシステムを適当な操作条件下で用いると本物の品物の取引と運送をモニター・制御・調節することができ、しかも製造業者と消費者の双方をある程度保護することになろう。次の3つの主要な保護機能を達成するように設計された完全に安全なシステムに対するニーズがある。

(a) ある品物のコピー(複数)品を製造・販売する権利をもたないコピー業者による、コピーされた假の品物の訴訟的販売から眞の製造業者を保護すること。

(b) コピーされた假の訴訟品の故意または偶然の販売からそ

特表昭63-503242(3)

れに気付かない消費者を保護すること。

(c) 政府および全ての適当な政府機関が、個別にしろ大量生産にしろ模倣された偽物品の販売を適宜追跡・調節・制御・取締り・かつ訴追する際に役に立つこと。

このたび、物品の真偽を立証する問題に対する新しいアプローチが開発された。本発明においては2つの重要な事実を考慮する。まず第一に、簡単な化学分析手順によってDNAまたはタンパク質自身のような分子の、存在または不存在を検出する能力を利用する。このような手順は、DNA（または別の巨大分子）が存在するか否かを示すプラス／マイナス試験である。異なる結果、すなわち異なる生体に由来するいろいろなDNA分子間に区別はない。しかし、このシステムの分解能は2番目の事実、すなわち核酸やタンパク質のような化合物の全配列または置換部分がもっている、一概的に認識され、したがってある物品が本物であることを明らかにする能力を利用することによりてかなり改善することができる。

したがって本発明は真偽を立証したい物品または物質を標識する方法を提供する。この方法は物品または物質を所定の巨大分子からなる第一の化合物によって標識することからなるがこの際この第一の化合物の同一性（種類）を標識（公表）すること

とが可能になったのである。本発明はタグ（目印）による本物の物品の認可された標識に依存する。このタグは、たとえば、このタグ（したがってこのタグが付けられている物品または物質）の真偽がこのタグの創作者（生産者、デザイナー）によってのみ決定できるような墨、彩墨およびタイプで1種類以上のシグナル化合物を担持している。

あらゆる物質または物品（物品）を標識することができる。本発明の技術は時計、香水および衣服のような高級品、医薬ならびにその他の肥料、除草剤および殺虫剤のような化学品、フィルムおよびレコード、銀行券、美術工芸品、パスポートのような医療品、さらに自動車部品のような器械・部品などを適用しうる。

標識はさまざまな方法で実施することができる。たとえば物品または物質の製造中にその中へ直接シグナル化合物を入れてもよい。あるいは、接着剤などによってシグナル化合物を付着させてもよい。この接着剤がシグナル化合物からなっていてもよい。またシグナル化合物は、物品または物質に液体として塗料またはインクのような材料中に含ませてもよい。物品または物質の内包装がシグナル化合物を含んでいてもよい。

シグナル化合物が付いているタグを用いて物品を標識しても

とはしない。この第一の化合物には相補的な第二の化合物が結合することがでて、その結果第一の化合物の存在を明らかにでき、したがって品物または物質が本物であることを立証できる。

本発明はまた、品物または物質の真偽を立証・確認するための方法も提供する。この方法は、

- I) 所定の巨大分子からなる第一の化合物の存在または不存在が具現化され得るように第一の化合物に結合することができる相補的な第二の化合物を用いて、品物または物質が前記第一の化合物によって標識されているか否かを決定し、それにより、
- II) 品物または物質の本物であることを決定することからなる。

便宜上ここでは第一の化合物をシグナル化合物と称する。このシグナル化合物は、たとえば核酸の場合には塗墨の、タンパク質の場合にはアミノ酸の配列からなり等、この配列には相補的な第二の化合物が結合する。ここではこの配列をシグナル配列と称する。

したがって、今や、各々が本物として一般的にしかも所定の程度の信頼性をもって認識され得るように性格な標識が埋められる品物もしくは物品または物質群もしくは物質群を標識すること

が可能になったのである。本発明はタグ（目印）による本物の物品の認可された標識に依存する。このタグは、たとえば、このタグ（したがってこのタグが付けられている品物または物質）の真偽がこのタグの創作者（生産者、デザイナー）によってのみ決定できるような墨、彩墨およびタイプで1種類以上のシグナル化合物を担持している。

シグナル化合物は、このシグナル化合物の存在の検出を可能にするように相補的な第二の化合物が結合することができる化合物である。シグナル化合物は核酸やタンパク質のような巨大分子である。そのような巨大分子の塗墨のシグナル化合物、すなわち墨の巨大分子を用いて品物または物質を標識してもよい。この巨大分子は合成品でもよいし、天然源から得られたものでもよい。したがってDNAの場合、ゲノムDNAまたはその酵母エンドヌクレアーゼによる部分消化によって得られるDNAを使用することができる。

しかしながら別方法として、標識としての使用条件に耐え得る酵母またはその他の生体の耐久性の形態にあるシグナル化合物を用いて品物または物質を標識してもよい。DNAおよび

(ある種のウィルスの場合の) RNAでは、シグナル化合物は生体のゲノム全体またはその一部でよい。したがって、特にウイルス、細菌およびカビのような微生物を標識として使用することができよう。これらは少量で、しかし固定可能な量で使用し得る。酵母の例は、S. cerevisiae、S. pombeもしくはS. uvarumのようなBacillusの種またはPenicilliumもしくはAspergillusのようなカビの種の酵素である。これらの場合DNAやRNAは再構成することができる生存系の中に含有され、そのDNAかRNAを固定することになるであろう。酵母DNAたとえばサケ精子DNA (Sigma S-1501) もシグナル化合物として使用できる。

各々が別々の領域を占める一連のいろいろなシグナル化合物を提供し得る。あるいは、別々の領域の一連の同じシグナル化合物を提供してもよい。この場合、いろいろな第二の粗略的化合物を使用して各領域のシグナル化合物内のいろいろなシグナル配列と結合させることができる。これは特にシグナル化合物が複数である場合に適用される。シグナル化合物は核酸、DNAまたはRNAが好みしい。

簡単にいえば標識の目的には單に巨大分子の存在または不存在を検出するだけで十分であろう。すなわち、ある種の目的に

達することによって異なる種のDNAおよび同じ種の異なる株のDNAを認識することが可能である。脊椎生体のゲノムDNAからランダムに得られたDNAの断片からなる特別に標識されたプローブを使用することができる。合成DNAプローブを使用してもよく、同様にR-13プローブ複合体のようなバクテリオファージプローブも使用し得る。また、プラスミドプローブを使用することができる。このプローブDNAは異なるDNA分子内に含有されているかもしれない複合DNA配列とハイブリダイズすることができる。

したがって本発明においては、品物または物質がシグナルDNAで標識され得る。このシグナルDNAは特定のプローブDNAとハイブリダイズすることができる配列を含んでいる。この配列がシグナル配列である。シグナルDNAとプローブDNAとの双方が精密にされている。標識されている品物または物質をプローブDNAを用いて分析した結果シグナルDNAのシグナル配列が見られた場合、この品物または物質は本物である。そうでなければその品物または物質は本物ではない。このプローブDNAはもちろん、ハイブリダイゼーションが生じたかどうかを簡便化するように、たとえば放射能もしくは酵素ラベルによって、ビオチニル化 (biotinylation) によって、または光

は、該の分子としての、または生体系の一部としてのDNAの存在を決定すれば十分であろう。DNAの存在を検出するには、エチクラムプロミド、アクリランオレンジまたはビス-ベンズイミド (B33258, Hoechst dye 33258) のような非特異的にDNAに結合する化学薬品を使用することができる。エチクラムプロミドの場合この化合物は普通の可視光の波長では検出できない。したがって標識はDNAとエチクラムプロミドと共に提供することによって達成し得る。これらの存在はその検査外線によって検出することができる。これによって簡単な検査方法が得られるが、高い程度の独自性は得られず、したがって高い安全性も得られない。それはプラス/マイナス試験である。

各種、さらに種内の各株に対するDNAの独自性と、独特のDNA分子を迅速、一斉的かつ正確に認識することに適する技術的水準とが相俟って、有生物と無生物とのあらゆる起源であらゆる種類の物品を、標識された物品が固定し得るように標識することの基礎となる。これによって、簡単なプラス/マイナス試験よりも洗練された形の標識が可能になる。

生体の各株についてDNAまたはRNAの分子は致密である。同じ種の異なる株は標識の配列における小さな変化によって異なっている。たとえば、標識したDNAプローブでDNAを検

ビオチニル化 (photobiotinylation) によって標識されている。シグナルDNAは1種以上の異なるシグナル配列を含んでいてよい。すなわち、同一のタグに対して所与のDNAシグナル分子を別個に複数使用して個々の特定DNAプローブのいずれを使用したかに応じた致密のシグナルを得ることができる。シグナル配列が反復して存在しているのが好みしい。これによつてプローブDNAに対するシグナル配列の密度が向上する。シグナルDNAは寄生者のゲノムDNAであるのが好みしいが、簡単な系では、合成して得られるような短いDNA配列を使用することもできる。ウィルスまたは最近のゲノムDNAを使用してもよく、同様にゲノムDNAを制限エンドヌクレアーゼで部分消化したものも使用できる。プラスミドも使用できる。

シグナルDNAのシグナル配列は、これとハイブリダイズすることができるプローブの入手容易性によってあらかじめ定められた配列とすることができる。それはDNA分子に固有の配列でもよい。あるいはまた、DNA分子の中に特別に導入してもよいし、DNA分子と組合してもよい。シグナル配列のサイズはプローブDNAに対する検出可能な応答が引き出されるようなものとすべきである。取扱上の理由から 1~10 kbp のシグナル配列が適切である。

シグナルDNAで標識された品物または物質が本物であるという確信がさまざまな程度で得られる。信頼性の程度はシグナルDNAを2種以上用いることによって向上することができる。品物または物質は、別々の領域が各々異なるシグナルDNAによって標識されていてもよい。シグナルDNAは別のDNAと混合して適用してもよい。これをここでは迷路DNAと称する。この迷路DNAが存在すると、シグナルDNAの正確なシグナル配列を決定しようとしている人の仕事が複雑になる。

本発明は以下のようにして適用され得る。一連の異なる微生物を個別に増殖させる。各々の微生物に対してゲノムDNAを抽出し、標準的な分子生物学の技術を用い、特定の制限エンドヌクレアーゼで消化して生成したゲノムDNAの短い配列をランダムにクローニングすることによって一組のいろいろなプローブを創造する。これによって、当該DNAを得ることができる微生物種のDNAをハイブリダイゼーションによって識別するプローブが生成する。したがってプローブDNAは、標的的にシグナルDNAのみが所有しているはずのシグナル配列を定める。

一般的なプローブが異なる種のDNAとハイブリダイズすることはありそうもないが、これは異なる起源のDNAに対して

そのプローブをハイブリダイズさせようとして見れば容易にチェックすることができる。クロスハイブリダイズするプローブはすべて棄却することができる。類似の手順を使用して、同じ種の異なる株から得たDNAに対するハイブリダイゼーションを調べることによって後に特異的なプローブを得ることができる。クロスハイブリダイズしないものは所与の種のある特定の株に対して特異的である。組にしたプローブを標識し、その機の使用に備えて貯蔵する。

タグを作るには、紙、精製したセルロースもしくはセルロースアセテートのシート、またはHybond EもしくはHybond N (Amersham International plc)などのようなナイロンベースの膜などといった適当な支持材料上の決められた位置にシグナルDNAを配置すればよい。シグナルDNAは、微生物の細胞から分離してかまたは処理済み細胞懸濁液もしくはペーストの形態で適用できる。このDNAはドット（点）またはバンド（帶）のいずれで適用することもできる。各々のドットまたはバンドは異なる微生物から得たDNAであるか、または異なるシグナルDNAを含んでいる。DNAは、プローブDNAとハイブリダイズすることができる形態で支持材料に結合する。すなわち、DNAは通常変性しておくかまたは一本鎖にしておく。典

型的な場合、各々別個の領域に適用されるシグナルDNAの量は10³～10⁴である。シグナルRNAとDNAの代わりに用いてよい。細胞やカビの粒子を直接使用してもよく、同様にウイルス粒子も使用できる。

こうして作成したタグを、真偽を立証したい品物または物質に結合する。そのようなタグによって標識されたなんらかの品物または物質の真偽を決定するには、貯蔵しておいた標識したプローブDNAを用いてタグを処理・加工する。プローブDNAをタグに接触させ、各シグナルDNAのシグナル配列に結合させる。プリセットパターンに従ってハイブリダイゼーションを観察して、標識された品物または物質が本物であることを確認する。

このようにして品物または物質が本物であるという非常に高度の信頼が達成できる。たとえば、タグがそれぞれ3つのドットのDNA 6列からなり、各DNAが異なるので、このタグを作るために少なくとも1000個の独特的なシグナル配列を与えるDNAの異なる1000個の配列が使用できると仮定しよう。1000個の別々の異なるDNAのアールからランダムに抜き出した3つのドットのいずれかの所与の列を偽造者が独立に再生できる確率は、パターンを作成するのに1000個のDNAを使用したことを見

遺者が知っている場合で10³に1である。いかなる偽造者でも、その人が生命体のずっと大きいサンプルから得たDNAに対する診断用DNAプローブの完全な一組をもっていない限り、いかなる方法によてもこのことを図り始めることさえできないのであるから、この技術の基盤を形成するのにどの1000個のDNAを選択したかを偽造者が知ってしまうという「差違のケース」の例でも起こらない限り、偽造者がこのパターンを再生できる確率を計算する直捷の道はない。この場合ドット18個の完全なタグについて偽造者が正確な列を再生する確率は10⁵⁴に1である。明らかに、いかなる信頼性限界も、タグのマーカーに利用できるシグナルDNAの数およびタグに適用するシグナルDNAの数に応じて選択することができる。

これらの要素は、本発明を適用し得るさらに進んだレベルにもあてはまる。これは、DNA制限酵素の多様性に基づく生体の同一性に沿ける微小な差の検出に依存する。これをいかに行なうかは我々のWO-A-86/02101に開示されている。これによって、いずれかの同一性（差別）は知られている第一と第二の生体が同一であるかどうかを決定するための方法が得られる。この方法は、

(1) 第一の生体のゲノムDNAを1種以上の制限エンドヌクレアーゼで消化し、

特表昭63-503242(6)

(II) こうして得られたDNA断片を電気泳動によって分離し、
(III) こうして分離した断片の、1種以上の第一の標準プローブとハイブリダイズする断片の位置を決定し（「ハイブリダイゼーションパターン」、「バンドパターン」または「マップ」）【このプローブまたは各々のプローブは第一または第二の生体と同じ種の生体のゲノムDNAからランダムに選択されたDNAの断片を含む】、

(IV) こうして決定された断片の位置を、前記第一のプローブまたはその各々に結合するDNA断片（これは第一の生体のゲノムDNAから得られたDNA断片と同じ方法によって第二の生体のゲノムDNAを前記の制限エンドヌクレアーゼまたはその各々で消化して第二の生体のゲノムDNAから生成しあつ電気泳動にかけておいたものである）の位置と比較することからなり。

ここで、ステップ(I)から(IV)は、ステップ(IV)での比較によってふたつの生体が同一でありそうであることが明らかにされた場合、このふたつの生体が実に異なる無関係のものとして区別され得ないという確率(X)、すなわち

$$X = F^d$$

(II)

【ただし、dはステップ(III)におけるプローブ検査によって

1つ以上の別の部分についてステップ(a)から(d)を繰返す
(ただし、毎回異なる前記のDNA断片からなる前記第二の標準プローブを用いる)
ことによって実現する。】

換言すると、dは、2つの生体が同一のマップをもっている場合、ステップ(IV)における第一と第二の生体の対比比較によって明らかにされたDNA消化断片の共通の位置の合計数である。

ステップ(I)から(IV)は、

(I') 第一の生体のゲノムDNAと第二の生体のゲノムDNAとを同じ制限エンドヌクレアーゼによって別々に消化し、場合によっては各消化物をいくつかの部分に分割し、

(II') 各生体について消化物または消化物の一部を平行してゲル電気泳動にかけ、

(III') 前記第一の標準されたプローブを用いてゲルをプローブ検査し、こうして観察された2つの生体のハイブリダイゼーションパターンを比較し、

(IV') 案によって、各生体の消化物の1個以上の別の部分について、ただし各回年に異なる前記のDNA断片からなる前記第一の標準されたプローブを用いてステップ(II')と(III')を

明らかにされた位置の数であり、Fは、第一と第二の生体と同じ種から独立に得られた生体の対のゲノムDNAを制限エンドヌクレアーゼ消化したものの間における、同一であるDNA断片の割合を表わす率である】によって決定される確率(X)が 10^{-12} 以下となるように、ステップ(III)におけるハイブリダイゼーションによって充分なバンドが具現されるような量のプローブDNAと1種以上の制限エンドヌクレアーゼを使用し、
(a) 前記第一と第二の生体と同じ種を代表するF値を得るのに充分な数の、前記種から独立に得た生体のゲノムDNAを、同じ制限エンドヌクレアーゼを使用して別々に消化し、場合によっては各々の消化物を別々の部分に分割し、
(b) 独立に得た生体の各々に対して消化物または消化物の一部を、平行してゲル電気泳動にかけ、
(c) 前記種の生体のゲノムDNAからランダムに得られたDNAの断片からなる第二の標準プローブを用いてゲルをプローブ検査し、
(d) こうして観察されたゲル上のハイブリダイゼーションパターンを、独立に得た生体の対合結合(pairwise combinations)に関して比較し、さらに
(e) 案によっては、独立に得た生体の各々に対する消化物の

相違す

ことによって実現するのが好ましい。

ステップ(I')から(IV')の手順は、各回年に異なる制限エンドヌクレアーゼを用いて二回以上実施することができる。

WO-A-86/02101 の方法は、2つの生体に対するハイブリダイゼーションパターンの間にある差を検出できないことがどの程度同一性の証明と考えられるかの程度に依存する。その方法を本発明に適用して、シグナルDNA（第一の生体）は、典型的な場合25~250μgの量でタグに適用（籠布）する。このタグを、真偽を立証したい品物または物質に付着（結合）させる。品物の真偽を決定するには、たとえば電気泳動によってシグナルDNAをタグから除去し、すでに防腐しておいた本物のシグナルDNA（第二の生体）と比較する。シグナルDNAのシグナル認別は、WO-A-86/02101 に従ってハイブリダイゼーションパターンを決定する際に使用するプローブとハイブリダイズする配列である。シグナル配列はあらかじめ決定し得る。プローブは先に標識して貯蔵しておくことができる。あるいはまたプローブは、ラベルから固定されるシグナルDNAを本物のシグナルDNAと比較する時点で製造することもできる。

WO-A-86/02101 の方法を利用することによって、あるシグナ

ルDNAが所与の種の特定の株に由来するものであることを所定の確率程度まで解析することができる。このように、組み加えられる各DNAについてそれが特定の株に由来するという信頼度を得ることができる。たとえば、 3×10^{82} に1回の信頼度で限って同一であるとされるような場合、同のタグの製造者が2つの正確なシグナルDNAを用いてタグを作成するチャンスは 9×10^{124} である。

また別の場合にはシグナル化合物がタクパク質であってもよい。ここで本発明はいろいろなタンパク質のアミノ酸配列の変化とそのような配列を認識する能力とによっている。たとえば抗原・抗体システムを使用してもよい。シグナル化合物が抗原として機能する場合、シグナル配列は抗体によって認識される抗原決定基である。シグナル化合物が抗体として機能する場合、シグナル配列はこの抗体の中で対応する抗原に結合する際に媒介となる配列である。抗原分子と抗体分子の双方がイムノクロプリンであるイディオタイプ・抗・イディオタイプシステムを使用してもよい。一方のイムノクロプリンが向方の抗原結合部位に対する結合特異性を有している。

抗体・抗原システムは以下のようにして用いることができる。一定の異なるハプテンのような、交差反応しない各種の異なる

抗原で動物器を免疫して抗体を因縁する。その動物から血清を収集し、自らの抗原に対して生じた抗体を精製する。次にこの抗体を、硝酸セルロースまたはナイロンベースの基材たとえばHybond G or Hybond Nのような適切な基材上に固定化する。抗体を付けたパターン化された一連のポイントを並みどおりに作り上げる。次いでこの結合用の段の非特異的結合特性をプロックする。この膜を乾燥し、プラスチックの下に密封し、真偽を立証したい品物または物質につなぐ。解決するには、特異的な抗原またはハプテンをタグに塗布する。適当な検出系を用いて結合を検出する。

本発明によって提供される安全性は、シグナル化合物が秘密に保たれる特定の暗号系に依存する。あらかじめ決定した所定のシグナル化合物を基盤に使用するが、その同一性（種類）は公表しない。どのシグナル化合物が使用されているかが肉眼の検査では明らかにならないようにして品物と物質を標識する。しかし、製造業者は、該物が容易に同定されるように自分の製品を安全に標識したいならば、それが本発明に従って標識されていることを公表するかあるいはこの実験を示さないで目的を達成することができる。

前者の場合、製造業者は広告によって、本物の製品がすべて

シグナル化合物で、たとえばタグの形態で保護されていることを宣言することができる。このタグは、取外しのできる自立つラベルを形成していてもよい。ただしこのラベル上には、なんらかの所属の印刷した情報、とくに製造業者の個々の独特のタグに対するバッチコード番号が出現するようになっている。製品を購入した消費者はこのタグを調査分析させるために寄送することができる。したがって偽って印明されたタグは容易に同定することができる。

後者の場合製造業者はタグの存在を公表することなく秘密裡にそのタグを自分の製品に付ければよい。製造業者の代理人が通常の消費者を経て小売店から製品をサンプリングすることによって、このタグの製造者は該物の製品が出現しているか否かを見分することが可能になる。

どちらの道を採用したとしても各々のタグはユニークであり且、かついろいろなシグナル化合物を有し得る。あるいは、同じシグナル化合物をもった1群のタグを使用してもよい。シグナルDNAを使用する場合、すでに記載したどちらのレベルでも作動するようにタグを設計することができる。

以下の実施例で本発明を例示する。

実施例 1 : *Lactobacillus plantarum* BT181 (NCIB 12156) の DNAに対するプラス/マイナス反応

Lactobacillus plantarum BT181 は NO-A-88/02101 に登録されている。これは、1985年 9月 25日、the National Collection of Industrial (現在は and Marine) Bacteria, Aberdeen, (英國) に登録番号 NCIB 12156として登録されている。NO-A-88/02101 に登録されているようにして BT181 からゲノムDNAを得た。このゲノムDNAを 100°で 5 分間加熱して変性した。

Hybond G または N のタグの材料上に DNA を付着させるためにこのタグの反対側から変性DNAの溶液の試料を塗布した。タグは次いで 37°C で 30 分間乾燥した。次に、60°C で 4 時間までペーリングすることにより、またはタグを 30 分間紫外光 (364nm) に露出することにより、変性DNAをタグに共有結合させた。いくつかのタグは、可燃性で透明な PVC (ICI plc) かサランラップ (Dow Corning) で被うことにより保護した。また、硝酸物とナイロン繊物 (シャツ) も変性DNAで標識した。各繊物に変性DNAの溶液を 100 倍ずつ加えた後空気中で乾燥した。5mg から 5mg の量のDNAをタグと繊物に塗布した。

その後、プラスチックフィルムが付いていたタグからそのフィルムを除去した。5mg / ml 木炭のエチゾウムプロマイドの溶

までこのタグを染色した。紫外線を照射(304nm)すると赤褐色のケイ光が発現された。これは、エチクムプロマイドがDNAに結合したことを意味している。類似のやり方でシャツの縫製物とナイロン織物のDNAが検出されている領域をエチクムプロマイド溶液で染色した。やはりケイ光が発現され、DNAの存在が明らかになった。

実施例2：固有で單一または低いコピー数のシグナル配列を用いたタグの製造

1. シグナルDNAとプローブDNAの調製

1.1. 微生物のDNAを選択する。

1.2. 標準的な手法によってゲノムDNAを調製・精製して純粋な高分子量のDNAを得る。

1.3. DNAを制限酵素（たとえばS_{ma}I）で消化してプローブ用の特異的配列を選択し、1%アガロースグル電気泳動によりDNAをサイズ分離し、これから、便利なサイズの断片を電気溶出し [McDonnel H.H.ら (1977) J. Molec. Biol., 110, 119参照]、選したプラスミドベクター中へクローニ化することができる。これらのクローンは次に、Zafatos C.S (1979) Nucleic Acids Research, 7, 1541の急速な「ドットプロット」法のようなテストを用いて他のDNAととの相容性を

2.2. この膜を乾燥し、密封する。

3. タグの製造

3.1. 同様にしている物品に対して調製したタグの本質的な特徴を記録するデータバンクを参照する。タグの上に印刷されている数を使用して、どんなDNAが使用されたか、およびシグナルドットマトリックス上にどのようにDNAを分布させたかを確認することができる。適当なプローブの混合物またはひとつつのプローブを一時に使用して、本物のDNAが検出されているであろう回収されたタグ上の部位に対するこれらのプローブの特異的ハイブリダイゼーションによってタグの真偽を証明する。

実施例3：選択DNAおよび多コピーDNA用いたタグの製造

1. 選択DNAの製造

1.1. 微生物のDNAを選択する。

1.2. 生体を成長させてDNAを得る。

1.3. DNAを抽出し、標準的な手法によって精製して高分子量のDNAを得る。

1.4. DNAを超音波処理して、選択したシグナルDNAの分子量に等しい平均分子量を有する分子の1個を得る。

試験することができる。この方法に従うと、所要のDNAと特異的にハイブリダイズする配列を選択することが可能になる。別途として、このようなプローブはLazar E.E.およびPalmer E. (1984) Cell, 37, 171-177の欠失富化技術のような富化技術を用いて固定することができ、こうすると労力が大幅に軽減される。

1.4. 適切なプローブを選択した後、標準的なプラスミド調製技術を用いてシグナルDNAを大量に調製し、抽出・精製して高分子量のDNAを得る。

1.5. シグナルDNAはいずれも、所要であればButler E.T. & Chamberlain H.H. (1982) J. Biol. Chem., 257, 5772が記載しているSP系列のベクターを使用することにより、一本鎖のRNA調導体に変換することができる。この調導体は一本鎖のDNAよりも迅速にDNAとハイブリダイズし、しかも制限酵素で切断することができない。

2. タグの製造

2.1. タグマトリックス上のドットの各々に対して、タグ膜上の選択された部位にそれぞれ選択した起始のシグナルDNA 5~10bp（または任意の充分量）を検出する。DNAを複数し、これを組たとえばHybond DまたはHybond Nに共有結合させる。

2.2. 膜を乾燥し、密封する。

2. シグナルDNAの調製

2.1. 微生物のDNAを選択する。これらは選択DNAの起始と同じであっても同じでなくてもよい。

2.2. 標準的な手法によってゲノムDNAを調製・精製して純粋な高分子量のDNAを得る。

2.3. DNAを制限酵素（たとえばS_{ma}I）で消化してプローブ用の特異的配列を選択し、1%アガロースグル電気泳動によりDNAをサイズ分離し、これから、便利なサイズの断片を電気溶出し [McDonnel H.H.ら (1977) J. Molec. Biol., 110, 119参照]、選したプラスミドベクター中へクローニ化することができる。これらのクローンは次に、Zafatos C.S (1979) Nucleic Acids Research, 7, 1541の急速な「ドットプロット」法のようなテストを用いて他のDNAととの相容性を試験することができる。この方法に従うと、所要のDNAと特異的にハイブリダイズする配列を選択することが可能になる。別途として、このようなプローブはLazar E.E.およびPalmer E. (1984) Cell, 37, 171-177の欠失富化技術のような富化技術を用いて固定することができ、こうすると労力が大幅に軽減される。

2.4. 適切なプローブを選択した後、標準的なプラスミド調製技術を用いてシグナルDNAを大量に調製する。同種の連鎖DNAかまたは異種の連鎖DNAに添加するのにシグナルDNAが必要な場合、このシグナルDNAはさらに精製しなければならない。すなわち、適当な酵素を用いて特異的シグナル配列を切除した後、標準的な手法により残留するプローブDNAからシグナルDNAを分離する。このような精製シグナルDNAはその後均等な平均分子量の洗浄された連鎖DNAに添加できる。

2.5. シグナルDNAはいずれも、所望であれば Butler E.T. & Chamberlain H.H. (1982) J. Biol. Chem., 257, 5772 が記載しているSP系列のベクターを使用することにより、一本鎖のRNA調導体に変換することができる。この調導体は一本鎖のDNAよりも迅速にDNAとハイブリダイズし、しかも酵素で切断することができない。

3. タグの調製

3.1. シグナルDNAを連鎖DNAと混合して、連鎖DNAの各単位に対して40~100 コピーの個々のシグナルDNA単位を得る。タグマトリックス上のドットの各々に対して、タグ膜上の選択された部位にDNAの複合物50~100ng (または任取

の充分量) を塗布する。DNAを変性し、これを度たとえば Hybond CまたはHybond Nに共有結合させる。

3.2. この膜を乾燥し、密封する。

4. タグの調製

4.1. 同時にしている物品に対して調製したタグの本質的な特徴を記載するデータバンクを参照する。タグの上に印刷されている数を使用して、どんなDNAが使用されたか、およびシグナルドットマトリックス上にどのようにDNAを分布させたかを確認することができる。その最も適切なプローブの混合物またはひとつのプローブを一時に使用して、本物のDNAが塗布されているであろう回収されたタグ上の部位に対するこれらのプローブの特異的ハイブリダイゼーションによってタグの真偽を証明する。

実験例 4 : 固有でコピー数の多い同一のシグナル配列を用いたタグの調製

Lactobacillus plantarum BTL81 のゲノムDNAから4種のプローブを調製した。これらのプローブは pBT18, pBT123, pBT129およびpBT130であった。これらのプローブの調製は NO-A-86/02101 に記載されている。そこに記載されているようにしてこれらのプローブを標識した。これらのプローブを、迅速な

「ドットプロット」法により他の起源のDNAとの相異性について試験した。特に NO-A-86/02101 に記載されているようにして使用した高解像条件下で試験した結果または他のいずれに由来するDNAとも有意にハイブリダイズしたものはないかった。これら試験した他のDNAが *Lactobacillus plantarum* に由来しないDNAとハイブリダイズすることを疑う理由はない。したがって、これらの4種のプローブは所与の種に独特のものであり、これら4種はいずれも *L. plantarum* DNAを検出するのに使用することができるであろう。さらに解析したところ、実験にはプローブ pBT129だけが *L. plantarum* のDNAと実際にハイブリダイズすることが示された。

L. plantarum BTL81のゲノムDNAを、実験例1に記載されているようにして Hybond CのタグまたはHybond Nのタグに共有結合した。実験例1に記載されているプラスチックフィルムで密封したタグを実験例1に記載されているようにして調製した。その後タグを密封しているプラスチックフィルムを除いて各タグの分析ができるようにした。

これらのプローブを使用して *L. plantarum* のシグナルDNAの存在を検出するために、これらのプローブを、 [³⁵S] - dCTP (テオキシンチクン5' - α [³⁵S] - チオトリホスフェ

ート) またはRenzoでラベルしたプローブ (Nucleic Acid Researc. 12, 3435-3444, 1984) 、すなわち酵素の西洋ワサビペルオキシダーゼに結合したプローブのどちらかで標識した。

ヒートシールしたポリエチレンバッグ (Pifco Ltd.) 中、20mg/mlの液性したニシン精子DNA (Sigma Chemical Co.) を含有するプレハイブリダイゼーションバッファー-[8×SSC; 5×Denhardt's溶液-0.1% (V/V)-ficolli-400, 0.1% (W/V)ウシ血清アルブミン、0.1% (W/V)SBS]中でタグを3時間洗浄した。新しいプレハイブリダイゼーションバッファー中65°Cでハイブリダイゼーションを実施し、標識されたDNAプローブを変性した後に最終濃度10~20μg/mlで加えた。ハイブリダイゼーション反応液を含有するシールしたポリエチレンバッグを65°Cで18時間インキュベートした。ハイブリダイゼーションの後、フィルターを65°Cの 2×SSC 中で15分ずつ二回、65°Cの 2×SSC, 0.1% (V/V)SBS 中で30分かけて一回、最後に65°Cの 0.1×SSC または 1×SSC である蒸留水漂浮液中で10分間洗浄した。次に、Whatman 3MMクロマトグラフィーパーパーを用いてフィルターをプロット乾燥した。

NO-A-86/02101 に記載されているようにしてオートラジオグラフィーか、または比色酵素反応 (Renzo) によって、同種の

たタグ上の部位の電気放出を実施した後、WO-A-86/02101 の方法に従って解析することによって解析を進める。

シグナルDNAの存在を検出した。前者の方法では、タグ上の同種シグナルDNAの位置はX線フィルム上に暗いスポットとして現われた。同様でないDNAの結合がない場合にはスポットは検出されなかった。同時に、Renzの技術では、*L. plantarum*のシグナルDNAおよびプローブDNAのハイブリダイゼーションが存在すると、酵素反応の黒い生成物が検出された。

実験例 5：より安全性の高いタグの製造

1. タグの製造

1.1. WO-A-86/02101 に記載の手順に従ってすでに特異的に固定されているDNAを有するいくつかの微生物から、高分子量の二本鎖DNAを調査する。

1.2. 250nmまでの選択したDNAを、タグ膜上の広さが約250μmの定められた部位に並布し、この膜からその後純粋な(Intact)DNAを溶出した。

2. タグの解読 (decoding)

2.1. 図版にしている書品に対して調査したタグの本質的な構造を記録するデータバンクを参照する。印刷されている数を使用して、どんなシグナルDNAが使用されたかを確認することができる。本物のDNAが並布されているであろう回収され

国際特許報告

International Application No. PCT/GB 87/00242

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (Not applicable under Article 19(2)(b), Patent Cooperation Treaty)		
According to International Patent Classification IPC or to one National Classification and/or:		
IPC ^a , G 09 F 3/00; // C 12 Q 1/00		
II. POLICY DIRECTED		
Information Document Searcher's Classification System		
IPC ^b	G 09 F	
Information Document Searcher's Classification System		
Information Document Searcher's Classification System		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE ANTECEDENTS		
Category I: Prior Art Documents, where necessary, the relevant sections of the document may be cited.		
Z	US. A. 3861986 (MELCOV) 28 January 1975 see column 3, lines 26-35; column 7, lines 5-16; column 10, lines 3-15; column 11, lines 39-50	1-2, 4-5, 17-19
A	—	16
Y	EP. A. 0133671 (MILES LABS. INC.) 6 March 1985 see pages 6-25	1, 2, 4-5, 17-19
A	—	7-13, 20-22
A	US. A. 4399452 (MINNESOTA MINING & MANUFACTURING CO.) 28 June 1983 see the whole document	1-4, 16
A	EP. A. 0111340 (INTEGRATED GENETICS, INC.) 20 June 1984 see the whole document	1, 2, 4-15, 17-22
A	US. A. 3733178 (ERICSSON) 15 May 1973 see column 1, lines 50-68; column 2,	1-4, 16-19
IV. DESCRIPTION OF RELATED ART		
A. Description of related documents:		
"A" documents are referred to in the claims as prior art. "P" documents are referred to in the claims as prior art. "D" documents are referred to in the claims as prior art. "E" documents are referred to in the claims as prior art. "F" documents are referred to in the claims as prior art. "G" documents are referred to in the claims as prior art. "H" documents are referred to in the claims as prior art. "I" documents are referred to in the claims as prior art. "J" documents are referred to in the claims as prior art. "K" documents are referred to in the claims as prior art. "L" documents are referred to in the claims as prior art. "M" documents are referred to in the claims as prior art. "N" documents are referred to in the claims as prior art. "O" documents are referred to in the claims as prior art. "P" documents are referred to in the claims as prior art. "Q" documents are referred to in the claims as prior art. "R" documents are referred to in the claims as prior art. "S" documents are referred to in the claims as prior art. "T" documents are referred to in the claims as prior art. "U" documents are referred to in the claims as prior art. "V" documents are referred to in the claims as prior art. "W" documents are referred to in the claims as prior art. "X" documents are referred to in the claims as prior art. "Y" documents are referred to in the claims as prior art. "Z" documents are referred to in the claims as prior art.		
B. Description of related documents:		
"A" prior art documents mentioned after the international filing date but before the priority date, which are referred to in the claims as prior art. "B" prior art documents mentioned after the priority date, which are referred to in the claims as prior art. "C" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "D" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "E" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "F" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "G" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "H" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "I" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "J" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "K" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "L" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "M" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "N" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "O" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "P" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "Q" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "R" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "S" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "T" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "U" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "V" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "W" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "X" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "Y" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art. "Z" documents of prior art mentioned in the claims, which are referred to in the claims as prior art.		
V. IDENTIFICATION		
Date of the Actual Filing of the International Patent 18th June 1987 Date of Filing of the International Search Report 28 JUL 1987		
Deposited Searching Authority EUROPEAN PATENT OFFICE Signature of Deposited Searching Authority H. VAN HOL		

VI. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (RELEVANT DOCUMENTS FROM THE ANTECEDENT ART)		
Category II: Other documents, which, although not mentioned in the application, may be relevant to the examination.		
Content of Document, and reference, where appropriate, of the relevant sections of the document to claim(s).		
Document ID Document No.		
Lines 57-65; columns 4-6		
A	US. A. 3773200 (MINNESOTA MINING & MANUFACTURING CO.) 13 November 1973 see abstract; column 6, lines 5-20	16
A	US. A. 4387112 (BLACH) 7 June 1983 see abstract	1, 2, 4, 16
A	US. A. 4363963 (SCHEPPAN et al.) 14 December 1982 see abstract	1, 2, 4, 16
A	Nucleic Acids Research, volume 13, 3 February 1985, IRL Press Limited, London, GB; A. C. Forster et al., "Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin", see pages 745-761	—
P.A.	WO. A. 86/02101 (BIOCOTECHNICAL LTD) 16 April 1986 cited in the application	—

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/GB 87/00242 (54 16773)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDV file on 08/07/87.

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A- 3861986	21/01/75	None	
EP-A- 0133671	06/03/83	AU-A- 3138784 JP-A- 60100056	07/02/85 03/06/85
US-A- 4380452	24/06/83	None	
EP-A- 0111340	20/06/84	JP-A- 51122499 US-A- 4388682 CA-A- 1211058	14/02/84 13/05/85 09/09/86
US-A- 3733178	15/03/73	None	
US-A- 3771200	13/11/73	US-A- 3897284	29/07/75
US-A- 4387112	07/06/81	None	
US-A- 4383965	14/11/81	None	
WD-A- 8602101	10/04/86	JP-T- 62500422 EP-A- 0227578	25/02/87 08/07/87

For more details about this annex:
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82